

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-009960  
 (43)Date of publication of application : 16.01.1996

(51)Int.Cl.

C12M 3/00  
 C12N 11/02  
 C12N 11/08

(21)Application number : 06-144277

(71)Applicant : NEC CORP

(22)Date of filing : 27.06.1994

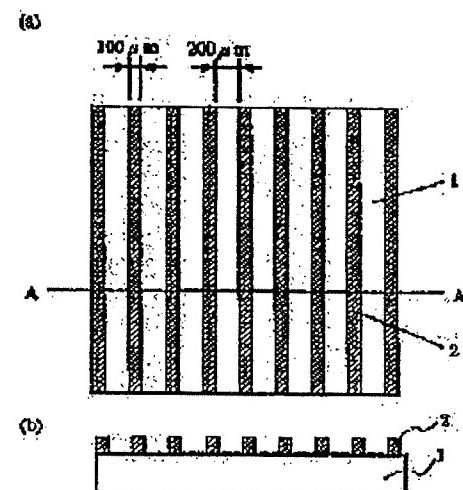
(72)Inventor : MIYAMOTO SHIGEYUKI

## (54) SUBSTRATE, ITS PREPARATION AND METHOD FOR FORMING CELL SEQUENCE

## (57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a substrate for cell culture useful for a biosensor, not bonding a cell to an enzyme membrane, forming a cell sequence, by partially removing a photoresist applied to a substrate, forming an immobilized enzyme membrane and then removing the photoresist.

CONSTITUTION: A photoresist is applied to a substrate 1 such as glass or quartz, exposed and developed to partially remove the photoresist on the surface of the substrate 1. Then, an immobilized membrane of an enzyme 2 such a glucose oxidase is formed on the surface of the substrate 1 and the photoresist on the surface after membrane formation is removed to give the objective substrate for cell culture. A cell is cultured by using the substrate for cell culture and a medium containing a fixed concentration of a substrate of an enzyme contained in the immobilized enzyme membrane 2 to preferably form a cell sequence.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.06.1994

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2570621

[Date of registration] 24.10.1996

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-9960

(43)公開日 平成8年(1996)1月16日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 M 3/00	A			
C 12 N 11/02				
11/08	B			
	C			

審査請求 有 請求項の数4 O L (全5頁)

(21)出願番号	特願平6-144277	(71)出願人	000004237 日本電気株式会社 東京都港区芝五丁目7番1号
(22)出願日	平成6年(1994)6月27日	(72)発明者	宮本 重幸 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内
		(74)代理人	弁理士 京本 直樹 (外2名)

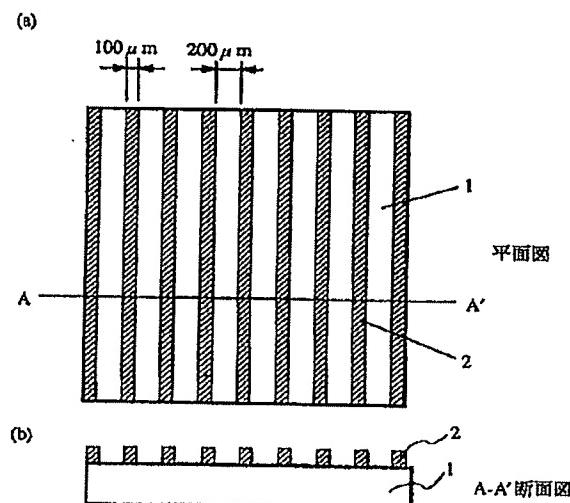
(54)【発明の名称】 細胞培養用基板とその作製方法および細胞配列形成方法

(57)【要約】

【目的】 基板表面の細胞接着性の制御が可能な、細胞配列を形成するための細胞培養用基板とその作製方法、およびこの細胞培養用基板を用いた細胞配列形成方法を提供する。

【構成】 石英基板1の一部の表面に、固定化グルコースオキシダーゼ膜2が形成された細胞培養用基板を、細胞配列の形成に用いる。

【効果】 酵素基質であるグルコースを含む培地を用いて細胞を培養すると、固定化グルコースオキシダーゼ膜2表面で酵素反応が起り、細胞の生育を阻害する生成物が生じるため、細胞は固定化グルコースオキシダーゼ膜2の表面には接着せず、石英基板1が露出した表面だけに接着し、細胞のバターニングが実現する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】接着性細胞を接着させ生育させる細胞培養用基板において、前記基板表面の一部分に固定化酵素膜が形成されることを特徴とする細胞培養用基板。

【請求項2】前記固定化酵素膜に含まれる酵素の基質が、配列を得ようとする前記細胞の生育に必要な物質であるかまたは前記細胞の生育を阻害する物質であるか、あるいは前記酵素膜に含まれる酵素の反応生成物が、配列を得ようとする前記細胞の生育に必要な物質であるかまたは前記細胞の生育を阻害する物質であることを特徴とする請求項1記載の細胞培養用基板。

【請求項3】基板にフォトレジストを塗布した後に、露光および現像を行うことにより前記基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、前記フォトレジスト除去工程後に前記基板の表面に固定化酵素膜を製膜する工程と、前記製膜後に前記基板のフォトレジストを除去する工程を有することを特徴とする細胞培養用基板の作製方法。

【請求項4】基板表面の一部分に固定化酵素膜が形成された請求項1または請求項2記載の細胞培養用基板を用い、前記固定化酵素膜に含まれる酵素の基質を一定濃度含む培地と共に細胞を培養することを特徴とする細胞配列形成方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞の配列を形成するために用いられる細胞培養用基板とその作製方法、およびこれを用いた細胞配列形成方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】現在、いろいろな動物や植物の細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法が開発されている。細胞培養の技術は、細胞の生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産などの目的で利用されている。さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生理活性や毒性を調べる試みがなされている。

【0003】一部の細胞、特に多くの動物細胞は、何かに接着して生育する接着依存性を有しており、生体外の浮遊状態では長期間生存することができない。このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための担体が必要であり、一般的には、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を均一に塗布したプラスティック製の培養皿が用いられている。これらの細胞接着性タンパク質は、培養細胞に作用し、細胞の接着を容易にしたり、細胞の形態に影響を与えることが知られている。

【0004】一方、培養細胞を基板上の微小な部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工臍器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着の

10

20

30

40

50

容易さが異なるような表面がパターンをなしているような基板を用い、この表面で細胞を培養し、細胞が接着するように加工した表面だけに細胞を接着させることによって細胞を配列させる方法がとられている。

【0005】例えば、特開平2-245181号公報には、回路状に神経細胞を増殖させるなどの目的で、静電荷パターンを形成させた電荷保持媒体を細胞培養に応用している。また、特開平3-7576号公報では、細胞非接着性あるいは細胞接着性の光感受性親水性高分子をフォトリソグラフィー法によりバターニングした表面上への培養細胞の配列を試みている。また、細胞非接着性表面を有した細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって細胞接着性の官能基を導入したり、細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって重合開始種を誘導し、この上に細胞接着性あるいは細胞非接着性モノマーを重合させるなどして表面をバターニングし、これによって細胞の配列を制御した特開平3-7577号公報の例がある。

【0006】さらに、特開平5-176753号公報では、細胞の接着率や形態に影響を与えるコラーゲンなどの物質がバターニングされた細胞培養用基板と、この基板をフォトリソグラフィー法によって作製する方法について開示している。このような基板の上で細胞を培養することによって、コラーゲンなどがバターニングされた表面により多くの細胞を接着させ、細胞のバターニングを実現している。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】従来の細胞配列を形成するための細胞培養用基板は、基板表面の細胞接着性が固定されている。つまり、作製された基板の細胞接着性表面を細胞非接着性表面に変えたり、逆に細胞非接着性表面を細胞接着性表面に変えるような、基板表面の細胞接着性の制御はできない。また、従来の細胞培養用基板で、2種類以上の細胞の配列を得ることは非常に困難であった。

【0008】本発明の目的は、表面の細胞接着性の制御が可能な、細胞配列を形成するための細胞培養用基板とその作製方法、およびこの細胞培養用基板を用いた細胞配列形成方法を提供することである。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するため、本発明の第1の発明は、接着性細胞を接着させ生育させる細胞培養用基板において、前記基板表面の一部分に固定化酵素膜が形成されることを特徴とする細胞培養用基板である。

【0010】第2の発明は、前記固定化酵素膜に含まれる酵素の基質が、配列を得ようとする細胞の生育に必要な物質であるかまたは細胞の生育を阻害する物質であるか、あるいは前記酵素膜に含まれる酵素の反応生成物が、配列を得ようとする細胞の生育に必要な物質である

かまたは細胞の生育を阻害する物質であることを特徴とする第1の発明に記載の細胞培養用基板である。

【0011】第3の発明は、基板にフォトレジストを塗布した後に、露光および現像を行うことにより前記基板表面の一部分のフォトレジストを除去する工程と、前記フォトレジスト除去工程後に基板の表面に固定化酵素膜を製膜する工程と、前記製膜後に前記基板のフォトレジストを除去する工程を有することを特徴とする細胞培養用基板の作製方法である。

【0012】第4の発明は、基板表面の一部分に固定化酵素膜が形成された第1の発明または第2の発明に記載の細胞培養用基板を用い、前記固定化酵素膜に含まれる酵素の基質を一定濃度含む培地と共に細胞を培養することを特徴とする細胞配列形成方法である。

【0013】

【作用】本発明の細胞培養用基板は、基板表面の一部分に固定化酵素膜が形成されている。この基板を、固定化酵素膜に含まれる酵素の基質を含む培地に浸漬すると、培地中の基質は固定化酵素膜の酵素によって消費され対応する生成物が酵素膜表面に生成する。そのため、固定化酵素膜が設けられていない表面に比べ、固定化酵素膜表面の局所的基質濃度は低く、局所的生成物濃度は高くなる。つまり、本発明の細胞培養用基板を用い、基質を含む培地中で細胞を培養すると、その基質が細胞の生育に必要な物質であったり、生成物が細胞の生育を阻害する物質であれば、固定化酵素膜表面への細胞の接着、生育は抑制される。一方、基質が細胞の成育を阻害する物質であったり、生成物が細胞の生育に必要な物質であれば、固定化酵素膜表面への細胞の接着、生育は促進される。このような機構により基板表面に所望の細胞のバターニングが実現する。

【0014】また、基板の固定化酵素膜表面の局所的基質濃度や局所的生成物濃度は、培地中に含まれる基質の濃度によって変化するので、培地中に含まれる基質の濃度を制御することによって、固定化酵素膜表面への細胞の接着、生育を制御することができる。例えば、固定化酵素膜に含まれる酵素の反応生成物が細胞の生育を阻害する物質である細胞培養用基板で細胞を培養する場合、基質を含む培地を用いると、固定化酵素膜表面には生成物が生成されるので、固定化酵素膜表面での細胞の接着が抑制される。しかし、基質を含まない培地を用いると、固定化酵素膜表面の局所的生成物濃度は0であるので、固定化酵素膜による細胞接着抑制効果はなくなり、細胞は固定化酵素膜表面に接着、生育する。このように、培地中に含まれる基質の濃度によって、固定化酵素膜表面を細胞非接着性表面に変えたり、細胞接着性表面に変えたりすることができる。

【0015】さらに、本発明の細胞培養用基板を用いれば、2種類以上の細胞の配列を得ることが容易になる。例えば、固定化酵素膜に含まれる酵素の反応生成物が細

胞の生育を阻害する物質である細胞培養用基板で細胞を培養する場合、まず、第1の種類の細胞を基質を含む培地で培養すると、細胞は固定化酵素膜表面を避けて接着する。次に、第2の細胞の種類を基質を含まない培地で培養すると、細胞は固定化酵素膜表面に接着、生育する。このようにして、細胞培養用基板の固定化酵素膜表面以外には第1の細胞が、固定化酵素膜表面には第2の細胞が接着し、2種類の細胞の配列を得ることができる。

【実施例】次に本発明の実施例について図面を参照して説明する。

【0017】(実施例1) 図1は、本発明の細胞培養用基板の一実施例を示した平面図(図1(a))および断面図(図1(b))である。細胞培養用基板の本体は厚さ0.5mmの石英基板1である。基板表面には、固定化酵素膜として固定化グルコースオキシダーゼ膜2が幅100μm、間隔200μmの縞模様で形成されている。固定化グルコースオキシダーゼ膜は、牛血清アルブミンのグルタルアルデヒド架橋膜を基体とし、グルコースオキシダーゼが包括固定化されたものである。

【0018】細胞培養用基板本体の材質は、ガラス、石英、シリコン、金属、ポリスチレンなどのプラスティックが使用できる。特に透明なガラス、石英、ポリスチレンは、透過型の生物顕微鏡で培養細胞の観察を行うことができる点で適している。

【0019】細胞培養用基板に設けられる固定化酵素膜に含まれる酵素は、その基質や生成物が細胞の生育に必要な物質であったり、細胞の生育を阻害する物質であればよい。グルコースオキシダーゼの場合、細胞の生育に必要なグルコースと酸素を消費し、細胞の成育を阻害する過酸化水素を生成するので、本発明に適用することができる。そのほかにも、ウレアーゼ、ウリカーゼ、乳酸オキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼなどが使用できる。

【0020】細胞培養用基板に設けられる固定化酵素膜の基体は、一般的な酵素固定化用材料を用いることができる。牛血清アルブミンの他にも、コラーゲンやアルギン酸ゲル、ポリビニルアルコールやポリアクリルアミドなどが利用できる。

【0021】細胞培養用基板の細胞接着性を向上させるためには、基板全面にコラーゲン吸着などの前処理を行ってもよい。また、本実施例の細胞培養用基板に設けられる固定化酵素膜は1種類であるが、2種類以上の固定化酵素膜を設けると、各々の固定化酵素膜の表面の細胞接着性を独立して制御できるためより複雑な細胞配列を得ることができる。

【0022】(実施例2) 図2(a)～(d)は、本発明の細胞培養用基板の作製方法の一実施例を示した作製

工程断面図である。以下に作製工程を順に説明する。まず、直径4インチの石英基板1に図2(a)のようにフォトレジスト3(シブレイ製マイクロポジットMP1300-37)を3000 rpmで30秒間スピンドル塗布し、90°Cで30分間乾燥させた。この際、ヘキサメチルシシラザンなど、基板とフォトレジストの接着性を向上させる試薬を基板に前処理してもよい。続いて、この基板にフォトマスクを通じて水銀ランプを照射し、デベロッパー(シブレイ製マイクロポジットMF-312)で現像処理を行い、図2(b)のように固定化酵素膜が形成される部分のフォトレジストを除去した。その後、基板に60mg/mlグルコースオキシダーゼ、1%グルタルアルdehyドを含む15%牛血清アルブミン0.6ミリリットルを3000 rpmで30秒間スピンドル塗布した。この際、3-アミノプロピルトリエトキシシランなど、基板と固定化酵素膜の接着性を向上させる試薬を基板に前処理してもよい。その後、20°Cで1時間放置して架橋反応を進め、図2(c)のように固定化グルコースオキシダーゼ膜2を形成した。最後に基板をアセトンに浸してフォトレジストを溶解し、水洗して図2(d)のような細胞培養用基板を得た。

【0023】(実施例3)本発明の細胞配列形成方法の一実施例について説明する。細胞培養用基板は大きさ20mm×15mmであり、実施例2と同様の方法で作製した。基板表面は半分の10mm×15mmに固定化グルコースオキシダーゼ膜が形成され、残り半分の10mm×15mmは石英が露出している。基板の細胞接着性を向上させるために、前処理として基板を0.03%コラーゲン水溶液に1時間浸漬した。

【0024】この基板をエタノールに浸漬、乾燥させることによって滅菌した後、底面20×15mm、高さ10mm、厚さ0.5mmの透明ポリエチレン製角型培養容器の底面に設置した。この培養容器に森永生化学研究所製の正常ヒトさい帯血管内皮細胞を播種した。培地には日本製薬製のMCD B104液体培地を用い、10ng/ml繊維芽細胞増殖因子を添加して用いた。細胞を播種した培養容器は37°C、5%二酸化炭素、温度飽和雰囲気のインキュベーターで12時間培養し、細胞が接着した基板を顕微鏡で観察した。

【0025】図3(a)は、この実施例で得られた基板表面の顕微鏡写真のイメージ図である。写真の上半分に固定化グルコースオキシダーゼ膜が形成されており、下半分は固定化グルコースオキシダーゼ膜が形成されておらず石英基板が露出している。細胞は固定化グルコースオキシダーゼ膜が形成された部分には接着せず、石英基板が露出した表面上のみに接着した。

【0026】図3(b)は、固定化グルコースオキシダーゼ膜の代わりにグルコースオキシダーゼを含まないアルブミン膜が形成された細胞培養用基板を用いた比較例の場合の、基板表面の顕微鏡写真のイメージ図である。

写真的上半分にアルブミン膜が形成されており、下半分は石英基板が露出している。図3(a)と異なり、細胞は全面に接着した。このことより、固定化グルコースオキシダーゼ膜が細胞の接着、生育を阻害することがわかる。

【0027】固定化グルコースオキシダーゼ膜による細胞接着、生育の阻害は次の機構で起こると考えられる。MCD B104培地には720mg/lのグルコースが含まれているので、固定化グルコースオキシダーゼ膜が形成された細胞培養用基板を浸漬すると、膜内でグルコースの酸化反応が進行する。この反応は、細胞の生育に必要なグルコースと酸素を消費し、細胞の成育を阻害する過酸化水素を生成する反応である。そのため、膜表面の細胞の接着、生育が阻害される。

【0028】また、本細胞配列形成方法をグルコースを含まない培地を用いて行うと、培地中にグルコースが含まれないため細胞接着数は図3(a)に比べて少ないと、細胞は全面に接着した。

【0029】本細胞配列形成方法に適用できる細胞は、固定化酵素膜に含まれる酵素の基質や生成物が配列を得ようとする細胞の生育に必要であるか、あるいは逆に生育を阻害する条件をみたすものであればよく、血管内皮細胞に限らない。本実施例に使用した細胞培養用基板に形成された固定化グルコースオキシダーゼ膜は、グルコースと酸素を消費するので、大部分の細胞に適用できる。一方、ある特定の物質に感受性の高い、あるいは要求性のある細胞であれば、この物質を消費、あるいは生成する酵素を用いた細胞培養用基板を用いることによって、この細胞に対する特異性が高い細胞配列形成方法となる。

#### 【0030】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の細胞培養用基板を用いれば使用する培地に含まれる基質濃度によって基板表面に形成された固定化酵素膜の表面への細胞接着性を制御することができる。つまり、培地に基質を入れるかどうかをスイッチとして、固定化酵素膜表面への細胞接着のオンオフを行うことができる。また、本発明の細胞培養用基板を用いれば、2種類以上の細胞の配列を得ることができ、培養細胞の人工臓器やバイオセンサへの応用が容易になる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の細胞培養用基板の一実施例を示した平面図および断面図である。

【図2】(a)～(d)は、本発明の細胞培養用基板の作製方法の一実施例を示した作製工程断面図である。

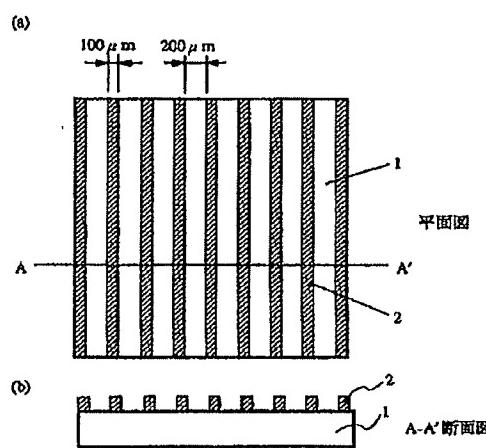
【図3】(a)は、本発明の細胞配列形成方法の一実施例によって得られた基板の顕微鏡写真のイメージ図であり、(b)は、アルブミン膜が形成された基板を用いた比較例の場合の基板の顕微鏡写真のイメージ図である。

#### 【符号の説明】

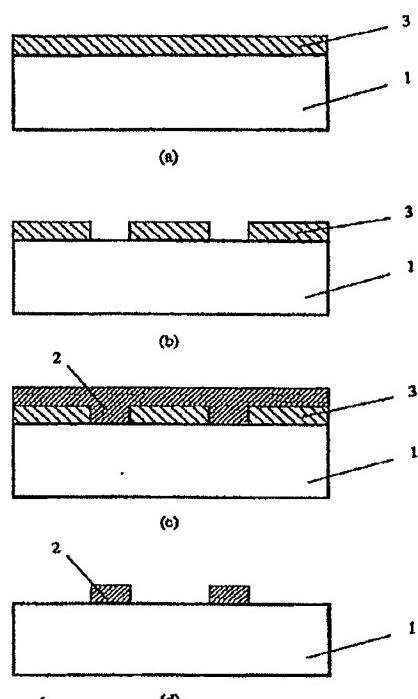
- 1 石英基板  
2 固定化グルコースオキシダーゼ膜

\* 3 フォトレジスト  
\*

【図1】



【図2】



【図3】

